

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C07H 1/08, 21/00, C12N 15/10, C12P 19/34</b></p>		<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 95/21178</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>10. August 1995 (10.08.95)</b></p>												
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP95/00390</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: <b>3. Februar 1995 (03.02.95)</b></p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p>													
<p>(30) Prioritätsdaten:</p> <table><tr><td>P 44 03 692.2</td><td>7. Februar 1994 (07.02.94)</td><td>DE</td></tr><tr><td>P 44 03 693.0</td><td>7. Februar 1994 (07.02.94)</td><td>DE</td></tr><tr><td>P 44 31 125.7</td><td>1. September 1994 (01.09.94)</td><td>DE</td></tr><tr><td>P 44 32 654.8</td><td>14. September 1994 (14.09.94)</td><td>DE</td></tr></table>		P 44 03 692.2	7. Februar 1994 (07.02.94)	DE	P 44 03 693.0	7. Februar 1994 (07.02.94)	DE	P 44 31 125.7	1. September 1994 (01.09.94)	DE	P 44 32 654.8	14. September 1994 (14.09.94)	DE	<p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
P 44 03 692.2	7. Februar 1994 (07.02.94)	DE													
P 44 03 693.0	7. Februar 1994 (07.02.94)	DE													
P 44 31 125.7	1. September 1994 (01.09.94)	DE													
P 44 32 654.8	14. September 1994 (14.09.94)	DE													
<p>(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): QIAGEN GMBH [DE/DE]; Max-Volmer-Strasse 4, D-40724 Hilden (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): COLPAN, Metin [TR/DE]; Uhlandstrasse 5, D-45219 Essen (DE). SCHORR, Joachim [DE/DE]; An der Schützenwiese 43, D-40231 Düsseldorf (DE).</p> <p>(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).</p>															
<p>(54) Titel: NUCLEIC ACID TRANSFECTION EFFICIENCY INCREASE BY USE OF ISOPROPANOL IN AQUEOUS SOLUTIONS</p> <p>(54) Bezeichnung: STEIGERUNG DER TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ VON NUCLEINSÄUREN DURCH DIE VERWENDUNG VON ISOPROPANOL IN WÄSSRIGEN LÖSUNGEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Isopropanol in aqueous solutions is used for chromatographically isolating nucleic acids and for increasing the transfection efficiency of the isolated nucleic acids in prokaryotic and eukaryotic cells.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Verwendung von Isopropanol in wässrigen Lösungen für die chromatographische Isolierung von Nucleinsäuren zur Steigerung der Transfektionseffizienz der isolierten Nucleinsäuren in pro- und eukaryontischen Zellen.</p>															

Steigerung der Transfektionseffizienz von Nucleinsäuren  
durch die Verwendung von Isopropanol in wäßrigen Lösungen

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Isopropanol in wäßrigen Lösungen zur Steigerung der Transfektionseffizienz von Nucleinsäuren in pro- und eukaryontischen Zellen.

Die DE 36 39 949 A1 der Anmelderin betrifft ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren, insbesondere langkettiger Nucleinsäuren. Dabei werden wäßrige Lösungen (Puffer) relativ niedriger Ionenstärke verwendet, um die zunächst bei niedriger Ionenstärke an einer Anionenaustauschermatrix adsorbierten Nucleinsäure zu waschen. Danach werden die Nucleinsäuren mit Puffern höherer Ionenstärke von der Matrix desorbiert. Ethanol kann dabei unter anderem zur Präzipitation von Nucleinsäuren, insbesondere DNA, eingesetzt werden. Niedere Alkohole enthaltende Lösungen werden in der P 43 21 904 der Anmelderin vorgeschlagen. Hierbei werden die niedere aliphatische Alkohole enthaltenden Lösungen in Zusammenwirkung mit chaotropen Ionen hoher Konzentration verwendet, um Nucleinsäuren an nicht mit Anionenaustauschergruppen modifizierten anorganischen Materialien zu adsorbieren.

- 3 -

In einer bevorzugten Verwendungsform wird dabei das Isopropanol in einer Menge von 1 - 50 Vol.-%, insbesondere 5 - 25 Vol.-%, besonders bevorzugt von 10 bis 15 Vol.-%, in den wäßrigen Lösungen vorliegen. Dabei können die wäßrigen Lösungen insbesondere auch für Anionenaustauscher übliche chromatographische Salze mono- oder divalenter Kationen, wie Natriumchlorid, Kaliumchlorid, etc. oder Kombinationen davon, enthalten. Die wäßrigen Lösungen sind vorzugsweise mit in der Molekularbiologie gebräuchlichen Puffersubstanzen, wie TRIS/HCl, MOPS, etc., gepuffert und weisen pH-Werte zwischen 6 und 9 auf.

Die erfindungsgemäße Verwendung des Isopropanols lässt sich insbesondere bei der Isolation von DNA, wie Plasmid-DNA, anwenden, ist jedoch nicht auf diese DNA-Arten beschränkt.

Die unter erfindungsgemäßer Verwendung von Isopropanol erhaltenen Nucleinsäuren sind insbesondere für den Einsatz in gentherapeutischen Verfahren geeignet.

Erfindungsgemäß werden ebenfalls Lösungen beansprucht, die Isopropanol in Mengen von 5 bis 60 Vol.-% enthalten können. Dies sind insbesondere die Waschpuffer, die gemäß DE 39 949 A1 eingesetzt werden können. Diese Puffer enthalten 0,5 bis 1,5 M Natriumchlorid oder Kaliumchlorid, 20 bis 80 mM MOPS oder TRIS/HCl bei einem pH-Wert von 6 bis 8. Erfindungsgemäß ebenfalls beansprucht werden wäßrige Lösungen unter Verwendung von 5 bis 60 Vol.-% Isopropanol enthaltend darüber hinaus 1,0 bis 2,0 M Natriumchlorid oder Kaliumchlorid, 20 bis 80 mM TRIS/HCl bei einem pH-Wert von 8 bis 9.

Die DE 39 13 814 A1 beschreibt in allgemeiner Form wäßrige Systeme in Puffern, die zur Elektroelution von Gelen verwendet werden können. Die dort beschriebenen Puffersysteme weisen beispielsweise Natriumchlorid, Puffersalze, wie MOPS, und niedere Alkohole, insbesondere C1 bis C4-Alkohole, auf.

Beispiel 1

Als Nucleinsäuren wurden im folgenden Plasmid-DNA aus *E. coli* analog dem in DE 36 39 949 A1 genannten Verfahren getrennt und isoliert. Dabei wird die Nucleinsäure an dem in der DE 36 39 949 A1 beschriebenen Anionenaustauschermaterial (QIAGEN®, Diagen GmbH, Deutschland) adsorbiert. Es wurde mit einem Puffer der Zusammensetzung 1,0 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Isopropanol, pH 7,0 gewaschen. Danach wurde die Plasmid-DNA mit dem isopropanolhaltigen Puffer der Zusammensetzung 1,25 M NaCl, 50 mM TRIS/HCl, 15 Vol.-% Isopropanol, pH 8,5 eluiert.

Dabei zeigte sich, daß die Ausbeute von Plasmid-DNA aus *E. coli* gegenüber der bekannten Präparation unter Verwendung von Ethanol um ca. 10% gesteigert werden konnte.

Mit der so erhaltenen DNA wurden dann Transfektionsexperimente durchgeführt. Die Transfektionseffizienz wurde über die Messung der lacZ-Aktivität bestimmt, wobei NIH 3T3-Zellen verwendet wurden. Diese Zellen wurden mit Hilfe der Kalziumphosphatmethode (Graham, F. L. and A. J. van der Eb (1973) "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA", Virology 52: 456 - 467) mit 1 µg des Reporterkonstrukts pRSVlacZ transfiziert (Lucibello, F. c. and R. Müller (1989) "Sensitive microscale assay for the analysis of promotor activity in eukaryotic cells", Methods Mol. Biol. 1: 9 - 18).

Die Tabelle zeigt die Transfektionseffizienz bei Verwendung verschiedener Alkohole, Ethanol reinst und vergällt, Isopropanol und n-Butanol.

A n s p r ü c h e

1. Verwendung von Isopropanol in wäßrigen Lösungen für die chromatographische Isolierung von Nucleinsäuren zur Steigerung der Transfektionseffizienz der isolierten Nucleinsäuren in pro- und eukaryontischen Zellen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Isopropanol in Mengen von 1 bis 50 Vol.-% in den wäßrigen Lösungen vorliegt.
3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Isopropanol in Mengen von 5 - 25 Vol.-% in den wäßrigen Lösungen vorliegt.
4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Isopropanol in Mengen von 10 - 15 Vol.-% in den wäßrigen Lösungen vorliegt.
5. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die wäßrige Lösung für die Anionenaustauscher-Chromatographie übliche Salze mono- oder divalenter Kationen, wie Natriumchlorid, Kalziumchlorid, Kaliumchlorid, etc., enthält.
6. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die wäßrige Lösung eine gepufferte Lösung ist.
7. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Nucleinsäure-DNA Plasmid-DNA ist.
8. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, zur Herstellung von Nucleinsäuren für die Gentherapie.
9. Wäßrige Lösung enthaltend 0,5 bis 1,5 M Natriumchlorid oder Kaliumchlorid, 10 bis 100 mM MOPS oder TRIS/HCl

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No  
PCT/EP 95/00390A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C07H1/08 C07H21/00 C12N15/10 C12P19/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07H C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 512 767 (BECTON, DICKINSON & COMPANY) 11 November 1992 see page 3, line 41 - line 45 ----	1-4,7,8
X	EP,A,0 512 768 (BECTON, DICKINSON & COMPANY) 11 November 1992 see page 3, line 39 - line 43 ----	1-4,7,8
P,X	DE,A,43 21 904 (DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 12 January 1995 see examples ----	1-4,6-8
X	WO,A,93 11221 (DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 10 June 1993 see the whole document -----	1-8

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

- \*&\* document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

4 July 1995

Date of mailing of the international search report

11.07.95

## Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

## Authorized officer

Day, G

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen  
PCT/EP 95/00390

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C07H1/08 C07H21/00 C12N15/10 C12P19/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C07H C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 512 767 (BECTON, DICKINSON & COMPANY) 11.November 1992 siehe Seite 3, Zeile 41 - Zeile 45 ---	1-4,7,8
X	EP,A,0 512 768 (BECTON, DICKINSON & COMPANY) 11.November 1992 siehe Seite 3, Zeile 39 - Zeile 43 ---	1-4,7,8
P,X	DE,A,43 21 904 (DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 12.Januar 1995 siehe Beispiele ---	1-4,6-8
X	WO,A,93 11221 (DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 10.Juni 1993 siehe das ganze Dokument -----	1-8

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siche Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert,

aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

'&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

4.Juli 1995

11.07.95

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Day, G